

## 人肝 Ferritin の H および L Subunit の分離精製と 再構成 Ferritin の免疫生化学的性状

大 塚 忍

札幌医科大学癌研究所内科学部門 (主任 漆崎一朗教授)

### Purification of H and L Subunit Types of Human Liver Ferritin and Immunochemical Properties of Reassembled Ferritin

Shinobu OHTSUKA

*Department of Internal Medicine, Cancer Research Institute,  
Sapporo Medical College  
(Chief: Prof. I. Urushizaki)*

Ferritin has 24 subunits arranged in the form of a hollow sphere which envelops an iron micelle in its central cavity. The protein is found in most mammalian tissues and is synthesized in response to iron. It sequesters the metal in an accessible form to provide a mobilizable reserve or source of iron in a nontoxic form for the organism's requirements. Ferritins from different organs of a single species may have common peptide sequences and other properties, but often exhibit small differences in electrophoretic mobility, amino acid composition and peptide map patterns. In addition, purified ferritin preparation from a single source may consist of a family of closely related proteins ("isoferritin"), that are resolved by isoelectric focusing methods. Since it is doubtful that there are one or more different ferritins from every tissue, tissue specificity and microheterogeneity have been attributed to the existence of a family of ferritin molecules with varying proportions of two different subunit types. The subunit with an electrophoretic mobility corresponding to a molecular weight of about 22,000 has been designated as the "H" type (Heavy or Heart), and the smaller polypeptide with a molecular weight of about 200,000 is the "L" type subunit.

In this report a simple preparative apparatus has been designed to isolate two structurally similar subunit types of ferritin. The procedure combines beneficial features of high resolution electrophoresis and gel filtration methods in sequential steps. Protein was recovered in high yield, and the resolution of this system far exceeded those attained by conventional ion exchange or gel filtration procedures.

Thus, purified subunits reassembled in a well defined manner and formed spherical particles that resembled natural apoferritin in electronmicrographs. The amino acid compositions of the subunits were similar, but the larger H subunit had fewer leucine, phenylalanine and arginine residues. It is therefore improbable that H subunits undergo proteolytic processing and are precursors for L subunits. Circular dichroism data suggested that homopolymer ferritins assembled from L type subunits had substantially more ordered secondary structures and greater  $\alpha$ -helical contents than their H counterparts. Reassembled H or L homopolymer ferritins migrated as families of proteins within discrete pI ranges in isoelectric focusing experiments as a consequence of the existence of subpopulations of each subunit type. Affinity chromatography methods were employed to obtain preparations of antibodies that interacted exclusively either with the H or with the L polypeptides, demonstrating that distinct immunological properties may be ascribed to each subunit of ferritin. The two classes of ferritin subunits are thus authentic polypeptide moieties with dissimilar properties and each may play a particular role in the function of this protein.

(Received September 29, 1980 and accepted October 27, 1980)

#### 1 緒 言

Ferritin は、ほぼすべての動、植物細胞に存在する組織

蛋白で24個の subunit が非共有結合により球状殻 (protein shell) を形成し、その中空に hydrated ferric oxide のミセルが核として存在している<sup>1-3)</sup>。

従来 ferritin は均一な蛋白と考えられてきたが、近年 Richter and Walker<sup>4)</sup> は腫瘍組織から抽出した ferritin が正常組織の ferritin と電気泳動上易動度を異にすること (腫瘍特異性) を見出し、また Linder *et al.*<sup>5)</sup>, Crichton *et al.*<sup>6)</sup> らは正常組織の ferritin が臓器により異った性状を有すること (臓器特異性) を報告した。さらに Drysdale,<sup>7)</sup> Urushizaki *et al.*<sup>8)</sup> は単一の臓器 (馬脾) から抽出した ferritin が等電点電気泳動上 microheterogeneity を示すことを認め、それがすべての種属、すべての臓器の ferritin にみられることから isoferritin と呼称し、腫瘍特異性や臓器特異性は isoferritin の phenotype が変化する現象としてとらえられた。その後 Adelman *et al.*<sup>9)</sup>, 渡辺, 新津<sup>10)</sup> は SDS ゲル電気泳動法による subunit の分析から ferritin には2つの subunit (H および L subunit) が存在し、すべての isoferritin は2種の subunit の量比を異にする hybrid 蛋白 (heteropolymer) として考え得ることを示唆した。しかし Harrison<sup>2)</sup> は結晶化した馬脾 ferritin を X 線解析し pseudo-icosahedral symmetry であることから ferritin の subunit は単一であると主張し、Bryce *et al.*<sup>11)</sup> および Bryce and Crichton<sup>12)</sup> は SDS ゲル電気泳動上みられる2種の subunit は、一方の subunit の proteolytic split を受けた産物であることを報告した。そこで本研究では上述の2種の subunit が実際に存在することを明らかにする目的で、尿素ゲル electrochromatography により両 subunit を分離精製し、さらにそれぞれの subunit から再構成した ferritin、つまり H および L 型 homopolymer ferritin を作製し、両者の免疫生化学的性状を検討したので報告する。

## 2 実験材料および方法

### 2.1 実験材料

人肝は、すべて死後1~3時間以内の病理解剖材料より得た。

人胎盤は、妊娠14週より20週で子宮筋腫のため子宮摘出術を施行した症例より得た。

### 2.2 実験方法

#### 2.2.1 組織 ferritin の抽出

人肝または胎盤組織を4倍の蒸留水 (0.1 mM phenylmethanesulfonyl fluoride を含む<sup>13)</sup>) とともに Waring blender で homogenize し、75°C、15分間加熱した後、4°C で 10,000×g 30分間遠心を行い上清を得た。その上清を Millipore filter (pore size 0.45 μm) で濾過した後、24,000 rpm 5時間 (Rotor: SW 27 (Beckman 社)) 超遠心を行い、褐色の pellet を得た。適当量の PBS (0.9% NaCl, 0.02 M sodium phosphate, pH 7.3) で pellet を十分に溶

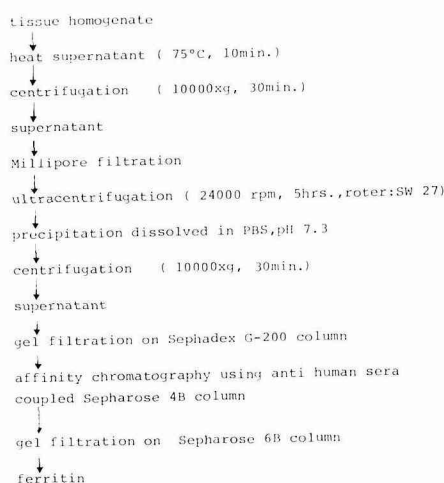


Fig. 1 Method for purification of ferritin.

解し、不溶性沈殿物を 10,000×g 30分間遠心することにより除去した。Amicon membrane XM 100 で濃縮した後、あらかじめ PBS で平衡化してある Sephadex G 200 column (2.5×100 cm) に添加し、流速 20 ml/hr, 分画量 5 ml でゲル濾過を行い、void volume にすぐ続いて溶出される褐色の粗 ferritin 分画を集めた。一方ヒト正常血清を同様に Sephadex G 200 column でゲル濾過し、ferritin とほぼ同じ部位に溶出される分画を集め、2・2・14 ならびに 2・2・15 の項に述べる方法で家兔に免疫し、抗血清 (Ig G 分画) を得た。さらに同 Ig G 分画を 2・2・16 の項で後述する方法により Sepharose 4B に固相化し Immunoabsorbent column を作製した。ついで同 column (1.5×3 cm) に上述の粗 ferritin 分画を添加し、流速 6 ml/hr, 室温で展開し、夾雑する血清蛋白を除いた。Column を通過する溶液を集め、約 2 ml に濃縮した後、あらかじめ PBS に平衡化してある Sepharose 6B column (2.5×100 cm) に添加し、void volume より遅れ溶出される褐色の主峰を集めた。このようにして精製された ferritin は polyacrylamide ゲル電気泳動では単一の band を、SDS ゲル電気泳動では ferritin subunit に相当する2本の band のみ示すことを確認した。

#### 2.2.2 polyacrylamide ゲル電気泳動法 (PAGE)

Polyacrylamide ゲル電気泳動法は、大略 O'Farrell<sup>4)</sup> の方法に従い、gradient slab ゲルを作成実施した。ゲルの組成は dense solution: 0.375 M Tris・HCl buffer, pH 8.8, 30% acrylamide [60% acrylamide-0.4% bisacrylamide (Bis)], 25% glycerol, 0.03% N, N, N', N'-tetramethylethylenediamine (TEMED), 0.03% ammonium persulfate, less dense solution: 0.375 M Tris・HCl buffer, pH 8.8, 0.03% TEMED, 0.03% ammonium

persulfate である。

dense solution 12.5 ml, less dense solution 25 ml 両液を温浴中で脱気し、4°C で冷却した後、ammonium persulfate を加え、two-chambered gradient mixer (和科盛商会) を用い、一点重層法で slab gel plate (13×13×0.1 cm) 内で化学重合した。gradient ゲルの終濃度は上方から 6~30% であった。gradient ゲルが重合した後、0.125 M Tris·HCl buffer, pH 6.8, 4.5% acrylamide (30% acrylamide-0.8% Bis), 0.03% TEMED, 0.03% ammonium persulfate を含む spacer ゲル 10 ml を重層し、同ゲルに comb で試料溝を作成した。試料は 10% glycerol と等量に混合して用いた。泳動用 buffer は 0.05 M Trizma base, 0.384 M glycine (pH 8.4) を用い、slab ゲル電気泳動装置 (和科盛商会) で brome phenol blue を marker dye として定電流 20 mA で泳動した。染色は 0.06% coomassie brilliant blue R-250, 50% TCA, 30% methanol 溶液中で 30 分間行い、ついで 30% methanol, 10% acetic acid 溶液により 1 昼夜脱色を実施した。

#### 2・2・3 sodium dodocyl sulfate (SDS) ゲル電気泳動法

SDS ゲル電気泳動法は、大略 O'Farrell<sup>14)</sup> の方法に従い、gradient slab ゲルを作成し実施した。ゲルの組成は dense solution: 0.375 M Tris·HCl buffer, pH 8.8, 30% acrylamide (60% acrylamide-0.4% Bis), 0.1% SDS, 25% glycerol, 0.03% TEMED, 0.03% ammonium persulfate, less dense solution: 0.375 M Tris·HCl buffer, pH 8.8, 0.1% SDS, 0.03% TEMED, 0.03% ammonium persulfate である。両液おのおの 25 ml を温浴中で脱気し、4°C で冷却した後、ammonium persulfate を加え、two-chambered gradient mixer (和科盛商会) を用い、一点重層法で slab gel plate (13×13×0.1 cm) 内で化学重合した。gradient ゲルの終濃度は上方から 11~30% であった。gradient ゲルが重合した後 0.125 M Tris·HCl buffer pH 6.8, 4.5% acrylamide (30% acrylamide-0.8% Bis), 0.1% SDS, 0.03% TEMED, 0.03% ammonium persulfate を含む spacer gel 10 ml を重層し、同ゲルに comb で試料溝を作成した。試料は試料用 buffer (0.125 M Tris·HCl buffer, pH 6.8, 1.5%  $\beta$ -mercaptoethanol, 2.3% SDS, 10% glycerol) と等量に混合した後、100°C で 5 分間加熱した。泳動用 buffer は 0.05 M Trizma base, 0.348 M glycine, 0.1% SDS 溶液 (pH 8.4) を用い、slab gel ゲル電気泳動装置 (和科盛商会) で brome phenol blue を marker dye として、定電流 20 mA で泳動した。染色は 0.06% coomassie brilliant blue R-250, 50% TCA, 30% methanol 溶液中で約 4 時間行い、ついで 30% meth-

anol, 10% acetic acid 溶液により 2 日間脱色を実施した。各 band の分子量は myoglobin, cytochrome C, ovalbumin, bovine serum albumin を標準蛋白として Maizel<sup>15)</sup> の方法により相対移動度から算出した。

#### 2・2・4 ゲル等電点電気泳動法<sup>16)</sup>

ゲルの組成は 4% acrylamide (28.38% acrylamide-1.62% Bis), 2% ampholyte (Brink Mann 社製 Phisolyte), 0.1% Triton X-100, 10% glycerol, 0.03% TEMED, 0.1% ammonium persulfate で Phisolyte は pH 4~6 域のものと pH 5~7 域のものを等量混合して使用した。上記溶液を polyacrylamide 薄層板 (1.5×120×250 mm) 内で重合後 LKB 2117 Multiphor を使用して、4°C 冷却下、等電点電気泳動を行った。陽極電解質として 1 M phosphoric acid, 陰極電解質として 1 N NaOH を用い、200 V 15 分間、300 V 30 分間、400 V 30 分間、合計 1 時間 15 分の pre-electrophoresis 後、試料を中央の試料溝に添加し、400 V 定電圧約 4 時間泳動した。試料の濃度が充分でない場合は、試料添加を数回にわけて行った。なお添加総量は約 20  $\mu$ g 以下に調節した。染色は 5% TCA, 5% sulfosalicylic acid, 30% methanol, 0.012% coomassie brilliant blue R-250 溶液で 4 時間、ついで 30% methanol, 10% acetic acid 溶液で 1 昼夜脱色を実施した。

#### 2・2・5 尿素ゲル電気泳動法

##### 2・2・5・1 酸性尿素ゲル電気泳動法

Panyim and Chalkley<sup>17)</sup> の方法に改良を加えて行った。ゲルの組成は 5% acrylamide (60% acrylamide-0.4% Bis), 9 M 尿素, 7.15% acetic acid, 0.5% TEMED, 0.125% ammonium persulfate である。温浴脱気後 ammonium persulfate を加え glass tube (0.5×7.5 cm) 内で化学重合した。試料は後述する尿素存在下で分離した ferritin の subunit 溶液を用い、disc 電気泳動装置 (ミツミ科学産業社) で, Pyronine Y を marker dye として、1 時間、2 mA/1 tube の pre-electrophoresis 後、試料を陽極側より添加し、4 時間 2 mA/1 tube で泳動を実施した。染色および脱色は 2・2・2 の項で述べた方法で行った。

##### 2・2・5・2 中性尿素ゲル電気泳動法

ゲル組成は 7.5% acrylamide (60% acrylamide-0.4% Bis) 9 M 尿素, 0.125 M Tris·HCl buffer pH 6.8, 0.5% TEMED, 0.125% ammonium persulfate である。温浴脱気後、ammonium persulfate を添加し、slab gel plate (13×13×0.1 cm) 内で化学重合した。泳動用 buffer は 0.05 M Trizma base, 0.384 M glycine 溶液 (pH 8.4) を用い、marker dye として用いた brome phenol blue が陽極電極槽に流出するまで pre-electrophoresis を実施した。その後試料を添加し定電流 20 mA で約 2 時間泳動し

た。染色および脱色は2・2・2の項と同様に実施した。

### 2・2・6 ヒト肝 ferritin の subunit への分解

Subunit の作成は Listowsky *et al.*<sup>18~20)</sup> らの方法に従った。つまりヒト肝 ferritin 溶液 (3 mg/ml) を 9 M 尿素に溶解後、濃塩酸で pH 2.5 に滴定し、10 分間 incubate した後 10 N NaOH で pH 6.8 に滴定し 57,000 × g 10 分間の遠心分離により無機イオン鉄コロイドを除去した。上清に含まれる蛋白は、SDS ゲル電気泳動法および円偏光二色性で subunit の状態に分解されていることを確めた。

### 2・2・7 ヒト肝 ferritin の 2 種の subunit の分離精製

2 種の subunit の分離は、著者ら<sup>21)</sup> が報告した preparative electrochromatography に改良を加え、Fig. 2 に示す装置を使用した。Column は LKB 2137 (2.6 × 65 cm) で、ゲル濾過用の充填剤として 9 M 尿素、0.125 M Tris・HCl buffer pH 6.8 で平衡化した Bio-Gel P-300 (Bio Rad 社) を用いた。充填剤の column 内保持、試料の濃縮を目的として、column 両端に中性尿素ゲル電気泳動用ゲル溶液、それぞれ 10 ml を化学重合させた。陰極電極槽 (上部槽) としてゲル濾過用充填筒 0.5 l (LKB 2137-036) を、陽極電極槽 (下部槽) として 4 l のガラス容器を用い、両電極槽の中に泳動用 buffer として 0.05 M Trizma base, 0.384 M glycine 溶液 (pH 8.4) を満たした。あらかじめ 9 M 尿素、0.5% β-mercaptoethanol, 0.125 M Tris・

HCl buffer, pH 6.8 に透析していた subunit 溶液 (蛋白量 7.10 mg) を添加し、定電流 20 mA で電気泳動を実施した。Marker dye である brome phenol blue が電極槽へ流出後 2 時間で電気泳動を終了した。次に column 両端の polyacrylamide ゲルをスパーテルで除去した後、column 内に気泡が生じないように注意深くブランジャーを挿入し、9 M 尿素、0.125 M Tris・HCl buffer, pH 6.8 で、流速 0.5 ml/hr でゲル濾過した。

得られた各分画の蛋白量および添加した試料蛋白量は、それぞれ透析により尿素を除去した後、Folin Lowry 法<sup>22)</sup> により測定した。

### 2・2・8 H および L 型 homopolymer ferritin ならびに heteropolymer ferritin の作成

Subunit からの ferritin 分子の再構成は、尿素を透析で除くことにより実施した。すなわち上述の方法で分離精製した subunit 溶液につき、SDS ゲル電気泳動を行い、H subunit または L subunit のみを含む分画を集めた。それぞれの溶液を別々に、および 3 対 1, 1 対 3 の比率で混合し、molecular cut off 3500 (Spetropore 社) の透析チューブを用い、透析外液 0.5% β-mercaptoethanol, 0.02 M phosphate buffer pH 7.3 に含まれる尿素濃度を 6 M, 4 M, 2 M と段階的に変化させながら 2 昼夜、室温で透析をくり返した。最終的に外液を蒸留水とし、さらに 1 昼夜 4°C で透析し、尿素および β-mercaptoethanol を完全に除去した。得られた蛋白を凍結乾燥により濃縮した後、PAGE および電子顕微鏡で再構成 ferritin であることを確認した。

### 2・2・9 電子顕微鏡実施法

Uranyl acetate を用いた negative staining 法で実施した。apoferritin (約 0.2 mg/ml), 再構成 ferritin (約 0.2 mg/ml) 溶液を各々 1 滴 grid 上に滴下、乾燥し、その後 1% uranyl acetate を滴下し carbon で被覆した。観察は Siemens 101 電子顕微鏡を使用し、94,000 倍で行った。ferritin 蛋白の大きさは、完全な形の分子 100 個を測定し、その平均値から算出した。

### 2・2・10 円偏光二色性実施法

円偏光二色性は、Carry 社の自動記録式偏光計 Model 60 に同社内偏光二色性測定装置 6001 を取りつけて測定した。セルは path length 1.0 および 0.1 cm のものを使用、温度 25, 27°C の条件下、蛋白濃度 0.10 から 0.25 μg/ml で、1 種類の蛋白につき、2 種以上の濃度条件で測定した。スリット幅 15 Å とし光学密度 1.8 以下に保ち実施した。

### 2・2・11 アミノ酸分析法

凍結乾燥した試料 (0.1~0.2 mg) を 1 ml の 6 N HCl 中で 110°C, 24 時間水解した。水解後、Technicon TSH 自

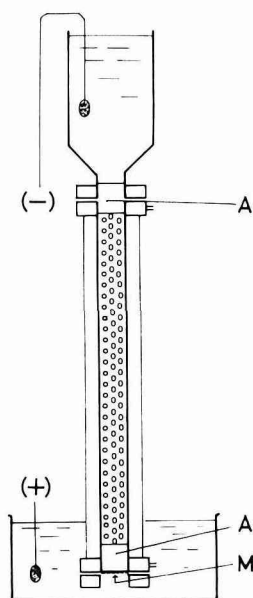


Fig. 2 Schematic representation of electrochromatography.

The layer of polyacrylamide gel is indicated as A. Gel matrix is supported by cheese cloth indicated as M.

動分析器により、同一試料につき3回分析、検討した。

#### 2・2・12 免疫2重拡散法

免疫2重拡散法は Ouchterlony<sup>23)</sup> の方法に従い、1% agar, 0.15 M NaCl 溶液 (pH 7.0) 中で、抗原濃度 300~700  $\mu\text{g}/\text{ml}$  とし行った。沈降線形成後 (24 時間後)、ゲルを湿潤した濾紙上、室温で乾燥させ、coomasie brilliant blue G-250 で染色した。

#### 2・2・13 免疫電気泳動法

免疫電気泳動法は Scheidegger<sup>24)</sup> の方法に従った。1% agar 中で veronal buffer (pH 8.2) を用い、抗原濃度 100~300  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 100 V とし、2 時間泳動した後、抗血清を中央の溝に入れ、24 時間ゲル内拡散を行った後、ゲルを PBS で充分洗浄し、Ponceau 3 R で沈降線を染色した。

#### 2・2・14 抗 ferritin 抗血清ならびに抗ヒト血清蛋白抗血清の作製

ヒト肝 ferritin, ヒト胎盤 ferritin, ヒト血清蛋白 (Sephadex G-200 ゲル濾過により ferritin と同じ部位に溶出される血清蛋白分画 2・2・1 参照) をそれぞれ抗原として Marcus and Zinberg<sup>25)</sup> の方法に準じて抗血清を作製した。あらかじめ Freund's incomplete adjuvant (ヤトロロン社) 10 ml と Mycobacterium butyricum (Difco 社) 20 mg を Potter 型 homogenizer で混和して complete adjuvant を作成した。次に抗原 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  を約 1 ml と Freund's complete adjuvant 1 ml を混じて emulsion とし、家兎の両大腿部に 0.25 ml ずつ、残りの 1.5 ml を背部皮内に接種した。2 週間後に同量の抗原を booster として接種した後、第 4 週目に全採血を行った。なお得られた抗 ferritin 抗血清の特異性に関しては、まず通常の血清蛋白との間に免疫電気泳動を行い、他の血清蛋白と反応のないことを確認した。さらに肝 homogenate との免疫2重拡散法により単一の band であることを確認した。

#### 2・2・15 抗血清からの Ig G の分画

抗血清より Ig G を分画するために Sober<sup>26)</sup> らの方法に従い、DEAE column chromatography を行った。抗血清を 40% 硫酸沈殿し、沈殿物を 0.01 M phosphate buffer pH 8.0 に溶解、同 buffer に透析した。あらかじめ同 buffer で平衡化した DEAE cellulose column に添加し、0~0.5 M NaCl の勾配をつけた同 buffer で溶出した。最初に溶出される蛋白を集め Ig G 分画とし、affinity chromatography に用いた。

#### 2・2・16 Affinity chromatography

##### 2・2・16・1 immunoadsorbent column の作成

臭化シアンを用いて活性化した agarose に L または H 型 homopolymer ferritin 10 mg あるいは抗ヒト血清蛋白家兎 Ig G 分画を固相化した immunoadsorbent column

を作製した。まず市販の CN Br activated Sepharose 4 B (Pharmacia 社) 0.5 g を、0.1 N HCl 中で 15 分間膨潤させ約 2 ml とし、同液 100 ml を glass filter 上で、洗浄をくり返し、さらに 0.5 M NaCl, 0.1 M sodium bicarbonate buffer pH 8.6 (coupling buffer) で洗浄した。次にあらかじめ coupling buffer で 48 時間透析した抗原あるいは抗体 10 mg/2 ml を disposable syringe (10 ml) にとり上述の洗浄したゲルを混合して、24 時間、4°C で回転混和し固相化した。この固相化したゲルを coupling buffer 100 ml で洗浄し、未結合の蛋白を除去した後、1 M ethanolamine, pH 8.0 で 2 時間、室温で反応させ、残存する活性基を block した。さらに coupling buffer 100 ml と 0.5 M NaCl を含む 0.1 M sodium acetate buffer, pH 4.0, 100 ml で交互に 3 回洗浄した後、最後に PBS で洗浄し immunoadsorbent column を作製した。

##### 2・2・16・2 L および H 型 homopolymer ferritin に対する特異抗体の精製

2・2・15 の項で分画した抗ヒト肝 ferritin 家兎 Ig G 分画は L 型 homopolymer ferritin を固相化した immunoadsorbent column に、抗ヒト胎盤 ferritin 家兎 Ig G 分画は H 型 homopolymer ferritin を固相化した immunoadsorbent column に添加した。室温で流速 6 ml/hr. で吸着させた後、PBS で洗浄し、2 M KSCN で溶出した蛋白を 72 時間 PBS に透析し、精製抗 H および抗 L 型 homopolymer ferritin 抗体を得た。

### 3 結 果

#### 3・1 ヒト肝 ferritin の subunit への分解

ヒト肝 ferritin の subunit への分解は、SDS を用いることが多いが、本研究では最終的に再構成 ferritin の作成を目的としたため、蛋白への結合性が強い SDS のかわりに尿素で分解を試みた。

Fig. 3 はヒト肝 ferritin の 9 M 尿素溶液 pH 2.5 および pH 6.8 における円偏光二色性所見を示した。ferritin 分子は、9 M 尿素溶液 pH 6.8 では 2 次構造に変化はなかったが、9 M 尿素溶液 pH 2.5 中、室温で 10 分間 incubate したところ、 $\alpha$ -helix、構造は完全に消失し、それを pH 6.8 に逆滴定を行っても ordered structure は改復せず、変性は不可逆的であった。

この様に 9 M 尿素溶液 pH 2.5 で処理したのち、中性の pH に逆滴定した蛋白と未処理の 9 M 尿素溶液中の蛋白を SDS ゲル電気泳動により検討したところ Fig. 4 に示すように未処理の蛋白は intact な ferritin 分子の易動度を示すのに対し、pH 2.5 で処理した蛋白は分子量 22,000 と 20,000 の 2 本の band として泳動された。前者は H sub-



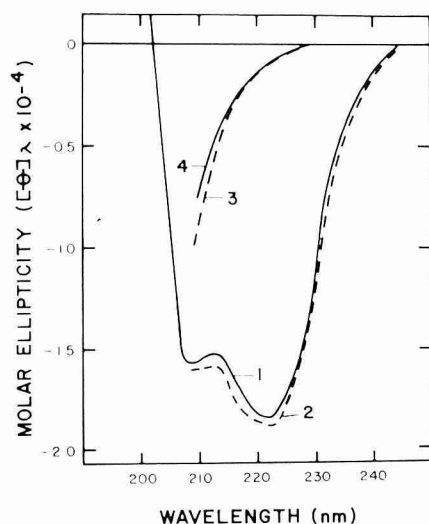


Fig. 3 Circular dichroism spectra. Curve 1 (solid line) is human liver ferritin in aqueous solution (pH 6.8). Curve 2 (dotted line) is ferritin dissolved in 9 M urea solution (pH 6.8). Curve 3 (dotted line) is the ferritin in 9 M urea (pH 2.5). Curve 4 (solid line) is ferritin incubated in 9 M urea (pH 2.5) for 10 min, and then the pH was adjusted to 6.8, before measurements were made.

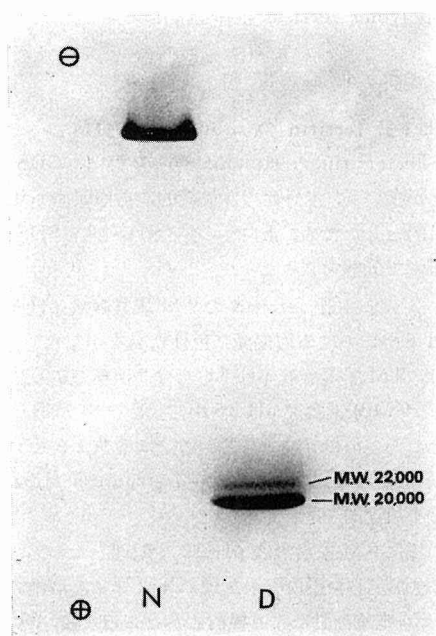


Fig. 4. SDS gel electrophoresis of native human liver ferritin (N) and dissociated human liver ferritin in acid urea (D).

unit, 後者は L subunit に相当した。すなわち本条件下で ferritin は完全に subunit に分解された。

### 3.2 尿素ゲル電気泳動法による両 subunit の分離条件の検討

尿素ゲル電気泳動法による両 subunit の分離条件を酸性緩衝液中ならびに中性緩衝液中で検討した。Fig. 5 A は一次元の尿素ゲル電気泳動に acetate buffer pH 3.2 を用い、2 次元に SDS ゲル電気泳動を行った所見である。尿素ゲル電気泳動で 2 本の band をみとめたが、その内、易動度の速いものは、2 次元の SDS 電気泳動上 L subunit に相当し、易動度の遅い band は H subunit に相当した<sup>20)</sup>。Fig. 5 B は一次元の尿素ゲル電気泳動に Tris-HCl buffer pH 6.8 を用い、2 次元に SDS ゲル電気泳動を行った所見である。やはり尿素ゲル電気泳動では 2 本の band を認めたが、酸性の pH 条件下とは異なり先行する band は SDS 電気泳動上、H subunit に相当し、他方の band は L subunit に相当した。すなわち両 subunit の分離は、SDS 電気泳動上のみならず、尿素ゲル電気泳動でも可能

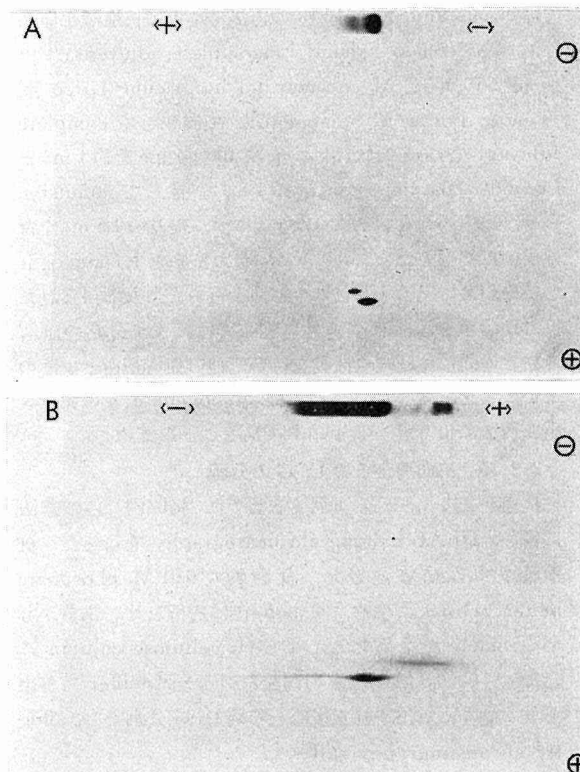


Fig. 5 Subunit analysis of human liver ferritin in two dimensional gel electrophoresis.

- A 1st Dimension acid-urea gel  
2nd Dimension SDS gel
- B 1st Dimension neutral-urea gel  
2nd Dimension SDS gel

であったが、pH 3.2 の条件と pH 6.8 の条件下で両 subunit は全く逆の易動度を示した。また両 subunit の分離の程度は pH 3.2 より pH 6.8 の条件の方が良好であった。

3.3 H および L subunit の分離精製

H および L subunit の分離精製は、上述の尿素ゲル電気泳動の結果に基づき、中性の pH 条件下での尿素ゲル electrochromatography により行った。Fig. 6 にその結果を示したが、subunit の溶出パターンは、marker dye である brome phenol blue の peak に続いて、fr 12 から fr 22 まで不均一だが2つの main peak からなっていた。挿入図には、その各分画の subunit の組成を SDS ゲル電気泳動で調べた結果を示してある。最初の分画に分子量 22,000 の均一な H subunit が溶出され、次第に L subunit が増加し、最後に分画は分子量 20,000 の均一な L subunit が溶出された。Table 1 は得られた各分画の蛋白量および添加した蛋白量を示した。総回収率は約 80% と満足すべきものであった。

3.4 H および L subunit から再構成した ferritin の性状

Electrochromatography で分画された subunit 溶液

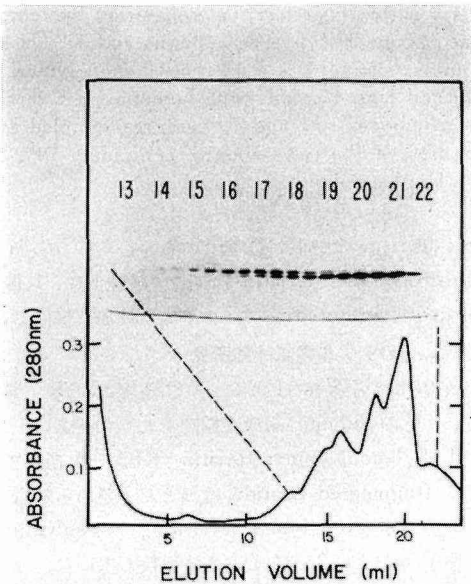


Fig. 6 Elution pattern for ferritin subunits after electromatography and SDS gel electrophoretic analysis.

Each channel in the gel represented one 0.5 ml fraction and lanes were numbered to the volume in the elution pattern shown below the gel.

Table 1 Recoveries of protein from the electrochromatography procedures

Fraction		mg of Protein
Pure H subunit	(12-14) <sup>a</sup>	0.11
H subunit enriched	(15-17)	0.48
L subunit enriched	(18, 19)	2.30
L subunit (hemogenous)	(20-22)	2.75
Total recovery		5.64
Protein applied		7.10

a: The numbers in parenthesis correspond to the lanes in the gel in Fig. 6.

Table 2 Amino acdi composiston of the two subunitis of human ferritin

Residue	H subunit	L subuit
Asx	28	23
Thr	8	8
Ser	12	10
Glx	30	27
Pro	4	4
Gly	12	14
Ala	16	17
Cys	2	1
Val	7	7
Met	4	2
Ile	6	5
Leu	23	28
Tyr	6	6
Phe	7	9
Lys	16	15
His	9	8
Arg	9	11

から実験方法 2.2.8 で述べたように尿素を除去し、再構成 ferritin を作成した。

3.4.1 アミノ酸分析所見

再構成した2種の homopolymer ferritin について、アミノ酸分析を行った。Table 2 はその結果であるが、両 homopolymer ferritin のアミノ酸組成は明瞭に異なり、L 型 homopolymer ferritin は H 型 homopolymer ferritin に比較し、leucine, phenylalanine, glycine, arginine などが明らかに多く、asparagine, aspartic acid, glutamine, glutamic acid が逆に少なかった。

### 3.4.2 polyacrylamide ゲル泳動所見

再構成 ferritin つまり H および L 型 homopolymer ferritin さらに両 subunit を 3:1 または 1:3 に混合させ得られた再構成 heteropolymer ferritin とヒト肝 ferritin について PAGE で検討したのが, Fig. 7 である. 各々の再構成 ferritin は, native ferritin に類似した単一の band を示し subunit に相当する分子量の小さな band は認められなかった. また H 型 homopolymer ferritin は L 型 homopolymer ferritin に比較し易動度が速く, heteropolymer ferritin については, その混合した subunit の量比により易動度がわずかながら異なり, H subunit の多いものほど速い易動度を示した.

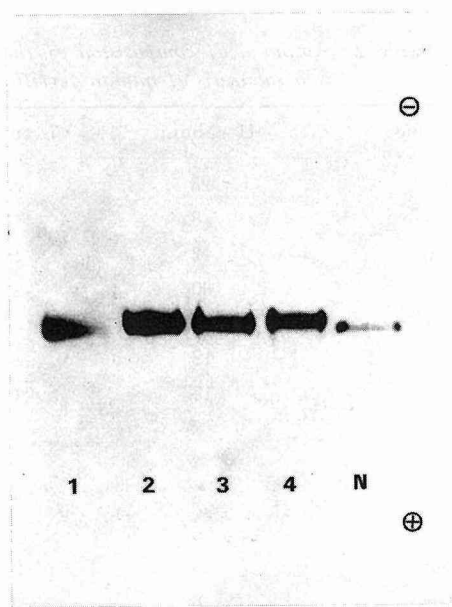


Fig. 7 Polyacrylamide gel electrophoresis of ferritin components assembled from subunits.

Lane 1 is a H type homopolymer ferritin and lane 4 is a L type homopolomer ferritin. The components in lanes 2 and 3 were reassembled from mixtures of the two subunit containing 75% and 25% H type subunits. N is a native liver ferritin.

### 3.4.3 slab ゲル等電点電気泳動所見

Fig. 8 は再構成 ferritin について slab ゲル等電点電気泳動で調べたものである. 各々の再構成 ferritin は数本の heterogenous な band に分離され, ヒト肝 ferritin に比べ, H 型 homopolymer ferritin は酸性側に, L 型 homopolymer ferritin は塩基性側に泳動された. また 2 種の heteropolymer ferritin は, いずれも両 homopo-

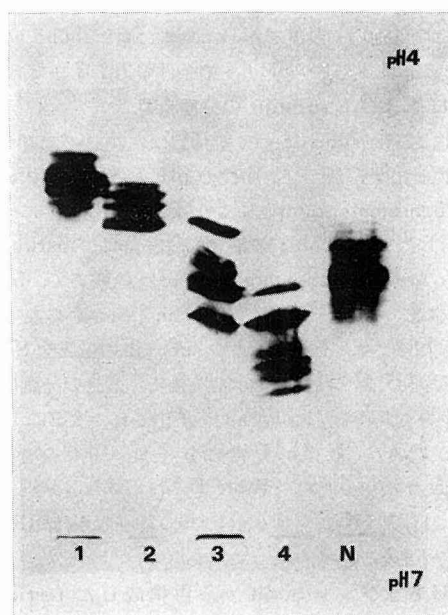


Fig. 8 Isoelectric focusing of reassembled components.

N is a native liver ferritin preparation (which contained about 70% L type subunits and 30% H type subunits). Lane 1 is a H type homopolymer ferritin and lane 4 is a L type homopolymer ferritin. The components 2 and 3 were reassembled from mixtures of the two subunits containing 75% and 25% H type subunits.

lymer ferritin の中間に泳動されたが, そのうち H 優位の heteropolymer ferritin は, より酸性側に, L 優位の heteropolymer ferritin は, より塩基性側に位置した.

### 3.2.5 SDS ゲル電気泳動所見

Fig. 9 は再構成 ferritin について再度, SDS 電気泳動を行い, その subunit 組成を確認したものである. H および L 型 homopolymer ferritin はそれぞれ極めて純度が高く fragmented peptide はほとんど認められなかった. 2 種の heteropolymer ferritin は, 両 subunit の混合比率 1:3 および 3:1 をそのまま保持していた.

### 3.4.6 電子顕微鏡所見

H および L 型 homopolymer ferritin の電子顕微鏡所見を Fig. 10 に示した. homopolymer ferritin はいずれも native apoferritin<sup>27)</sup> とほぼ同様な hollow sphere を形成していたが, 中には矢印で示した分子の如く不完全な蛋白殻も認めた. H 型 homopolymer ferritin の直径は平均 130 Å, L 型 homopolymer ferritin のそれは 110 Å で, 両者に約 10% の差異が認められた.



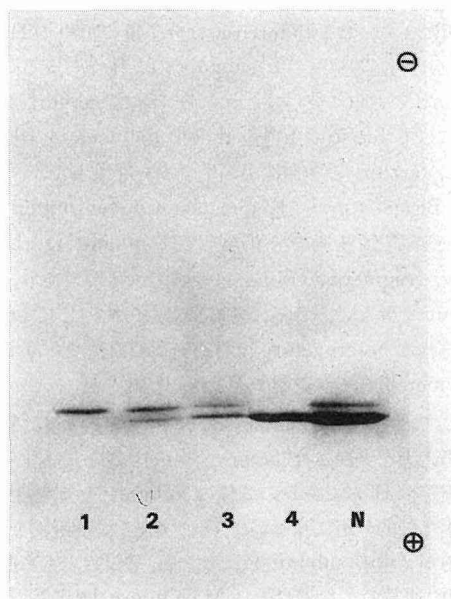


Fig. 9 SDS gel electrophoresis of reassembled components.

N is a native liver ferritin. Lanes 1 and 4 are homopolymer ferritin. Lanes 2 and 3 are heteropolymer ferritin.

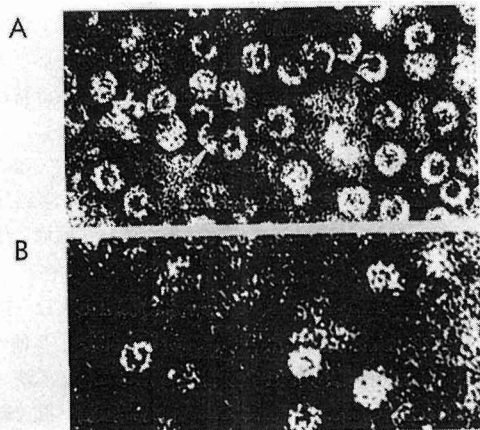


Fig. 10 Electron micrographs of reassembled ferritin.

Plate A is a component reassembled from L subunits. Plate B is a reassembled H type homopolymer ferritin. Arrow indicates incomplete protein shell. Primary magnifications were  $94,000\times$  and the magnification shown is  $47,000\times$ .

### 3.4.7 円偏光二色性所見

H および L 型 homopolymer ferritin ならびにコントロールとして人肝 ferritin の円偏光二色性所見を Fig. 11 に示した. L 型 homopolymer ferritin は人肝 ferritin と同様, 規則正しい 2 次構造を有し,  $\alpha$ -helix 含量約 50% であった. それに対し H 型 homopolymer ferritin は  $\alpha$ -helix 含量 30% と低値で, 両者の 2 次構造上の差異は明らかであった.

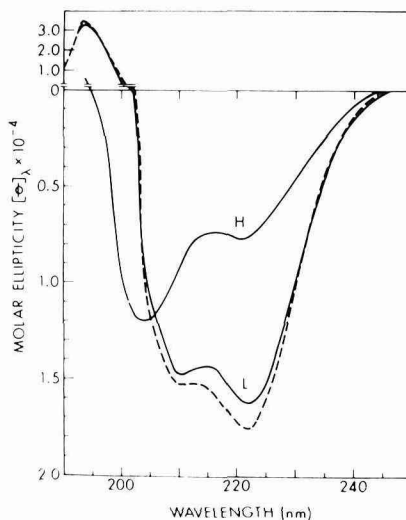


Fig. 11 Circular dichroism spectra of reassembled H and L type homopolymer ferritin.

The dotted line represents a spectrum of native liver ferritin. H and L are reassembled homopolymers.

### 3.4.8 免疫二重拡散法所見

Fig. 12 A は抗 H ならびに抗 L 型 homopolymer ferritin 抗体に対するヒト正常肝 ferritin の反応を調べたものだが, 両抗体はヒト正常肝 ferritin と明らかな沈降線を形成し, その沈降線はお互いに完全に癒合した.

Fig. 12 B は, これらの両抗体を用いて, H ならびに L 型 homopolymer ferritin との反応性を調べたものである. 抗 H 型 homopolymer ferritin 抗体は H 型 homopolymer ferritin と特異的に反応し, 抗 L 型 homopolymer ferritin 抗体は L 型 homopolymer ferritin と特異的に反応した. つまり抗 H 型 homopolymer ferritin 抗体と L 型 homopolymer ferritin, 抗 L 型 homopolymer ferritin 抗体と H 型 homopolymer ferritin との間には交叉反応性は全く認められなかった.

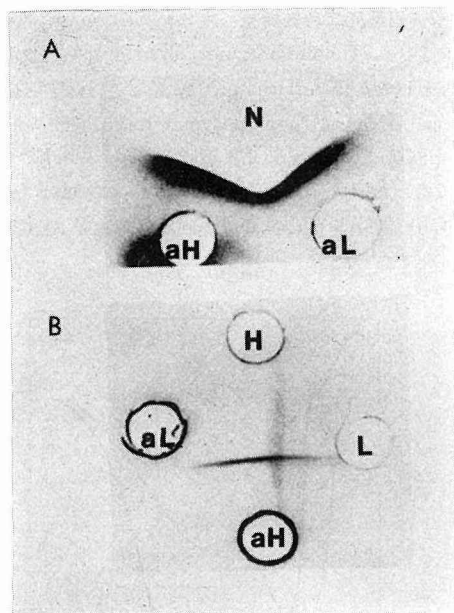


Fig. 12 Immunological analysis of human ferritin subunit.

Ouchterlony double immunodiffusion reactions between native liver ferritin (N), reassembled H type homopolymer ferritin (H), and reassembled L type homopolymer ferritin (L), with anti H sera (aH) and anti L sera (aL).

### 考 按

ferritin は比較的古くから、あらゆる動物の組織に見出されていた蛋白であるが、変性剤や蛋白分解酵素などに対する抵抗性が強く、加えて鉄イオンを多量に含むために、蛋白化学分析は必ずしも充分になされていなかった。

1963年 Harrison<sup>2)</sup> は X 線解析、超遠心分析法を用いて ferritin 分子が 20 個の均一な subunit よりなると報告した。その後 Bryce and Crichton<sup>12)</sup> は SDS ゲル電気泳動法を用いた分子量の測定から subunit の数は 24 個であると訂正したが、subunit の種類はやはり単一であると考えた。しかし 1965 年 Richter and Walker<sup>4)</sup> が腫瘍 ferritin の特異性を報告し、続いて Linder *et al.*<sup>5)</sup>, Crichton *et al.*<sup>6)</sup> が正常組織においても臓器により ferritin の性状が異なることを見出し、さらに 1970 年 Drysdale<sup>7)</sup>, Urushizaki *et al.*<sup>8)</sup> が単一臓器 (馬脾) から抽出した ferritin にも microheterogeneity の存在することを明らかにするにおよんで ferritin subunit の均一性を再検討する必要性が生じた。

最近 Adelman *et al.*<sup>9)</sup> および渡辺、新津<sup>16)</sup> らは Tris・glycine buffer, Tris・acetate buffer での SDS ゲル電気

泳動法や酸性尿素ゲル電気泳動法による ferritin subunit の分析により、ヒト肝 ferritin は分子量 22,000 の H subunit, 分子量 20,000 の L subunit の 2 種から成ることを報告した。さらに彼らはこれらの 2 種の subunit が量比を異にして ferritin 蛋白殻 (heteropolymer) を形成するために ferritin の多様性が生ずると推論した。それに対し, Bryce *et al.*<sup>11)</sup> は, phosphate buffer system での SDS ゲル電気泳動の分析から, H subunit は, L subunit の fragment が dimer を形成したものであり, 真の subunit ではないと考え, 各種臓器から抽出した ferritin にみられる heterogeneity は真の臓器特異性であり heteropolymer 構造では説明できないと反論した。

そこで著者は, Adelman *et al.*<sup>9)</sup> および渡辺、新津<sup>16)</sup> らの考え方を発展させ heteropolymer 説を実証するために, 実際に H および L の 2 種の subunit を分離精製し, 免疫生化学的分析に基づいて, その実在を証明せんとした。ところが 2 種の subunit は, 分子量, 等電点ともに酷似しており, 通常のゲル濾過法, CM cellulose, DEAE, TEAE などのイオン交換クロマト法などでは, 分離精製不可能と考えられた。そこで本研究では電気泳動法とゲル濾過法を組み合わせた electrochromatography を用いて 2 種の subunit の分離精製を試みた。本法はもともと蛋白分離の目的で Nerenberg and Pagoeff<sup>28)</sup> により開発されたもので, その原理は polyacrylamide ゲル電気泳動により分離した蛋白を下方のゲル濾過用 column に導いた後に, 電気泳動を中止し, そのままゲル濾過を行い溶出するという方法である。しかしながら, 彼らが当初発表した装置は特殊なガラス器具を使用し, 操作自体も煩雑であるために, これまで広く応用されるにはいたらなかった。本実験ではこれらに改良を加え操作が簡便で安価な通常のゲル濾過用 column を使用し, subunit を分離するために緩衝液に尿素を加えた。

ところで ferritin subunit の電気泳動法としては一般に SDS ゲル電気泳動法が用いられている。しかし 2 種の subunit を分離, 精製するという目的のためには, 本法での分離能は充分ではなく, また SDS 自身が蛋白へ強く結合するために, それを完全に取り除くことが困難である。そこで SDS の代りに蛋白への結合性が低い尿素を変性剤として用い electrochromatography を行った。まず尿素による subunit への分解条件を円偏光二色性, SDS ゲル電気泳動で検討した。その結果 9 M 尿素 pH 2.5 という過酷な条件ではじめて完全に subunit へ分解することが出来た。またこのようにして一度 subunit へ分解した後 pH を中性にどうしても subunit の再会合は起こらなかった。次に尿素中での electrochromatography を検討した。一

般に尿素中での電気泳動は蛋白質の carbamylation を防ぐために酸性の緩衝液中で行われる。しかし ferritin の subunit を同条件で泳動してみたところ、両 subunit の分離は必ずしも満足すべきものではなかった (Fig. 5 A)。また分子量の小さな L subunit が分子量の大きな H subunit より速く泳動されるため、続いてゲル濾過を行う際に H subunit が L subunit に接近しながら溶出され、電気泳動で分離された両 subunit が再び混合されるという不都合性が生じた。これに対して中性の緩衝液中で尿素ゲル電気泳動を行うと両 subunit の分離は極めて良好であり、しかも H subunit が L subunit に先行して泳動された (Fig. 5 B)。すなわち尿素中での electrochromatography には中性の緩衝液が最も適していると考えられた。なおその際、carbamylation を可及的に防ぐことを目的として、lysine の  $\epsilon$  の位置にあるアミノ基と競合する Trizma base を緩衝液の組成として選んだ。またゲル matrix には高濃度の尿素に対して安定で、かつ分子量 22,000 の H subunit と 20,000 の L subunit を分離可能と考えられる Bio-Gel P-300<sup>29)</sup> を用いた。

以上の検討に基づき electrochromatography を実施したところ、充分な純度を有する H subunit, L subunit の分離精製に成功した。実際に両 subunit を分離精製したという事実は、H subunit が L subunit の proteolytic fragment の dimer であるとする Bryce *et al.*<sup>11)</sup> の報告や、電気泳動上認められる 2 つの band は、変性剤の結合量が異なり、完全に変性しなかった際、認められる conformational isomers であるとする May and Fish<sup>29)</sup> らの報告を否定するものであった。次にこの 2 種の subunit を含む溶液をそれぞれ透析し、尿素を除いた上でアミノ酸分析を行った。その結果 2 種の subunit はアミノ酸組成が類似していながらも、それぞれ特異性を有していた。このことは Arosio *et al.*<sup>31)</sup> が SDS ゲルを切断、摩砕して抽出した両 subunit の peptide map において共通する peptide と異った peptide をともに認めた事実と矛盾しない。しかしながら H subunit が L subunit の前駆体であるとする考え方は、分子量の小さな後者に leucine, phenylalanine, arginine などのアミノ酸がより多く含まれているという結果から否定的である。最近、教室の高後<sup>32)</sup> はラット肝から ferritin の mRNA を抽出し、cell free translation system で H および L subunit に相当する translation product の合成に成功しており、上述のアミノ酸分析の結果と考え併せると両 subunit は固有の gene product である可能性が強い。

ところで ferritin の subunit は、相互作用が極めて強固であり、また一旦変性剤により分解された subunit も、

注意深く変性剤を除く事により、比較的容易に再会合することが知られている。本研究では精製された H および L subunit を用い、その homopolymer ferritin ならびに両者を適当比で混合させた heteropolymer ferritin の作製を試みた。その結果再構成された ferritin は電子顕微鏡上、一部 subunit が欠けた不完全な分子や、半月状に二量体を形成したものが認められたが、おおむね native ferritin に類似した分子形態を示した。このことはそれぞれの subunit 間に類似した interaction domain が存在し、subunit の相互作用を容易にしていることを思わせる。また H 型 homopolymer 分子の直径は L 型 homopolymer 分子の直径より約 10% 程大きかったが、これは両 subunit の分子量の違いを反映しているものと考えられた。

また、PAGE、等電点電気泳動法により、再構成 ferritin を検討したところ、H 型 homopolymer ferritin は易動度が速く、等電点はより酸性であり、L 型 homopolymer は最も易動度が遅く、等電点がより塩基性であった。heteropolymer ferritin は PAGE 上両 homopolymer ferritin の中間の易動度を示し、等電点電気泳動ではやはり両者の中間域に等電点を有しながらも、それぞれ subunit の量比を反映し、H subunit の多いものほど酸性側に、L subunit の多いものほど塩基性側に泳動された (Fig. 8)。

すなわち、2 種の subunit の量比を変化させることによって実際に種々の isoferritin を作成することが可能であった。なお両 homopolymer ferritin が等電点電気泳動法で必ずしも均一な band を示さなかった点については i) 等電点電気泳動法に用いた ampholine に不連続性があるため、ii) 再構成 homopolymer ferritin がすべて完全な分子となっていないため、iii) 尿素中での carbamylation が完全に防げなかったため、などの理由が考えられるが、いずれも推測の域を出ない。

H および L 型 homopolymer ferritin の差異は、さらに円偏光二色性を用いた 2 次構造の検索によっても明らかであった。すなわち L 型 homopolymer ferritin は  $\alpha$ -helix 含量が 50% であるのに対し H 型 homopolymer ferritin のそれは 30% と、前者は後者に比べより規則正しい構造を示した。先に電子顕微鏡の所見で L 型 homopolymer ferritin が H 型 homopolymer ferritin より小型の分子形態をとることを示したが、これは両 subunit の分子量の差異を反映していることの他に、2 次構造の上でより規則正しく、より compact であることをも反映しているものと思われる。最近 Lavoie *et al.*<sup>33)</sup> は胎盤より抽出した ferritin の  $\alpha$ -helix 含量がヒト肝 ferritin のそ

れより低いことを報告しているが, homopolymer ferritin についての上述の所見とよく一致している。

ところで, このように作成された2種の homopolymer ferritin は, 1次構造, 2次構造上の違いのみならず免疫学的反応性においても明らかな差異が認められた。Fig. 12Bに示す如くH型 homopolymer ferritin は抗H型 homopolymer ferritin 抗体と特異的に反応し, 抗L型 homopolymer ferritin は抗L型 homopolymer ferritin 抗体とのみ反応した。互いの交叉反応は全く認められなかった。すなわち各 isoferritin は免疫学的に異なることが明らかとなった。最近, ferritin の微量定量法<sup>34,35)</sup> が種々開発され, 血清 ferritin の測定が可能となったが, その多くは免疫学的反応を利用したものであり, 上述の isoferritin の免疫学的差異は, 測定値の評価に重要な意味を持つものと考えられ, 今後大きな課題であろう。

以上, *in vitro* において homopolymer ならびに heteropolymer ferritin の再構成に成功したが, 得られた再構成 ferritin についての電気泳動, 円偏光二色性, 免疫学的特性は, いずれも isoferritin=heteropolymer 説を実証するものであった。

今後は, これらの結果に基づき, さらにHおよびL subunit について, NおよびC末端分析, peptide map, アミノ酸配列の解析を進めるとともに, 生体における isoferritin の機能的生理的意義をも明らかにしていく必要がある。

## 結 語

ヒト正常肝より抽出した ferritin を electrochromatography で2つの subunit に分離した後, 再構成 ferritin を作成し, アミノ酸分析, PAGE, 等電点電気泳動, 電子顕微鏡, 円偏光二色性, 免疫二重拡散法により調べ, 以下の結果を得た。

1) 9M尿素中での electrochromatography によりH subunit とL subunit との分離精製が可能であった。

2) 両 subunit のアミノ酸組成は明らかに異なり, しかもH subunit に比べて, 分子量の小さいL subunit に leucine, phenylalanine, arginine などの分子量が多いために, 前者が後者の前駆体であるという可能性は否定された。

3) PAGE ならびに等電点電気泳動上, 再構成 ferritin は native ferritin とほぼ同様の性状を示し, H型 homopolymer ferritin は最も酸性側の等電点を, L型 homopolymer ferritin は最も塩基性側の等電点を有していた。heteropolymer ferritin はその混合した subunit 比に従い, H subunit の多いものほど, 酸性側に泳動された。

4) 電子顕微鏡上, native ferritin に類似した分子形態を示し, H型 homopolymer はL型 homopolymer ferritin に比較し, 直径が約10%程大であった。

5) 円偏光二色性では, HおよびL型 homopolymer ferritin は2次構造上明らかに異なり, 後者は前者に比べ  $\alpha$ -helix に富み, より規則正しい構造を保持している。

6) 免疫二重拡散法では, HおよびL型 homopolymer ferritin は固有の抗原決定基を有していることが明らかとなった。

以上の結果, ferritin には2種の subunit が存在し, 2種の subunit の量比を反映して isoferritin が生ずるという事実を *in vitro* の再構成実験により証明した。

稿を終るに臨み, 御指導, 御校閲下さった本学癌研究所内科, 漆崎一朗教授, 新津洋司郎講師ならびに, 円偏光二色性, アミノ酸分析について適切な討議をしていただいた Albert Einstein 医科大学生化学 Irving Listowsky 教授に深謝いたします。

## 文 献

1. Harrison, P. M., Hoare, R. J., Hoy, T. G. and Macara, I. G.: Ferritin and haemosiderin; structure and function. In: Jacobs, A. and Worwood, M. (ed.): Iron in Biochemistry and Medicine. 73-109, Academic Press, London (1974).
2. Harrison, P. M.: The structure of apoferritin; molecular size, shape and symmetry from X-ray data. J. Mol. Biol. **6**, 404-422 (1963).
3. Niitsu, Y. and Listowsky, I.: The distribution of iron in ferritin. Arch. Biochem. Biophys. **158**, 276-281 (1973).
4. Richter, G. W. and Walker, G. F.: Reversible association of apoferritin molecules; comparison of light-scattering and other data. Biochemistry **6**, 2871-2880 (1967).
5. Linder, M. C., Moor, J. R., Munro, H. N. and Morris, H. P.: Ferritin isoproteins in normal and malignant rat tissues. Gann Monograph on Cancer Research **13**, 299-313 (1972).
6. Crichton, R. R., Millar, J. A., Cumming, R. L. C. and Bryce, C. F. A.: The organ-specificity of ferritin human and horse liver and spleen. Biochem. J. **131**, 51-59 (1973).
7. Drysdale, J. W.: Microheterogeneity in ferritin molecules. Biochim. Biophys. Acta **207**, 256-258 (1970).
8. Urushizaki, I., Niitsu, Y., Ishitani, K., Matsuda, M. and Fukuda, M.: Microheterogeneity of horse

- spleen ferritin and apoferritin. *Biochim. Biophys. Acta* **243**, 187-192 (1971).
9. Adelman, T. G., Arosio, P. and Drysdale, J. W.: Multiple subunits in human ferritins; evidence for hybrid molecules. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **63**, 1056-1062 (1975).
  10. 渡辺直樹, 新津洋司郎: Isoferritin の hybrid 構造と免疫学的特性に関する研究. *札幌医誌* **48**, 385-396 (1979).
  11. Bryce, C. F. A., Magnusson, C. G. M. and Crichton, R. R.: A reappraisal of the electrophoretic patterns obtained from ferritin and apoferritin in the presence of denaturants. *FEBS Letter* **96**, 257-262 (1978).
  12. Bryce, C. F. A. and Crichton, R. R.: The subunit structure of horse spleen ferritin. *J. Biol. Chem.* **246**, 4198-4215 (1971).
  13. Lavoie, D. J., Marcus, D. M., Ishikawa, K. and Listowsky, I.: Ferritin and apoferritin from human liver; aspects of heterogeneity. In: Brown, E. B., Aisen, P., Fielding, J. and Crichton, R. R. (ed.): *Proteins of Iron metabolism*. 71-78, Grune & Stratton Inc. (1977).
  14. O'Farrell, P. H.: High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* **250**, 4007-4021 (1975).
  15. Maizel, J. V.: Polyacrylamide gel electrophoresis of viral protein. In: Maramorosch, H. (ed), *Methods in Virology*. Vol. 5, 179-186, Academic Press, N. Y. (1971).
  16. Vestergaard, O. and Svensson, H.: Isoelectric fractionation, analysis, and characterization of ampholytes in natural pH gradients. IV. Resolving power in connection with separation of myoglobins. *Acta Chem. Scand.* **20**, 820-834 (1966).
  17. Panyim, K. and Chalkley, R.: High resolution acrylamide gel electrophoresis of histones. *Arch. Biochem. Biophys.* **130**, 337-346 (1969).
  18. Listowsky, I., Blauer, G., Englund, S. and Bethel, J.: Denaturation of horse spleen ferritin in aqueous guanidium chloride. *Biochemistry* **11**, 2176-2182 (1972).
  19. Listowsky, I., Englund, S., and Bethel, J.: Conformation of ferritin and apoferritin in solution. Optical rotatory dispersion properties. *Biochemistry* **6**, 1341-1348 (1967).
  20. Lavoie, D. J., Marcus, D. M., Ishikawa, K. and Listowsky, I.: Correlations between subunit distribution, microheterogeneity and iron content of human liver ferritin. *Biochemistry* **17**, 5448-5454 (1978).
  21. Otsuka, S. and Listowsky, I.: High-resolution preparative electrochromatography for purification of two subunit types of ferritin. *Analyt. Biochem.* **102**, 419-422 (1980).
  22. Lowry, O., Rosebrough, N., Farr, L. and Randall, R.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275 (1951).
  23. Ouchterlong, O.: *In vitro* method for testing the toxin-producing capacity of diphtheria bacteria. 8th Scandinavian Pathological Congress 1947. *Acta Path. Microbiol. Scand.* **25**, 186 (1948).
  24. Scheidegger, J. J.: Une micro-méthode de l'immuno-électrophorèse. *Int. Arch. Allergy* **7**, 103-110 (1955).
  25. Marcus, D. M. and Zinberg, N.: Isolation of ferritin from human mammary and pancreatic carcinomas by means antibody immunoadsorbents. *Arch. Biochem. Biophys.* **162**, 493-501 (1974).
  26. Levy, H. B., Sober, H. A.: A simple chromatographic method for preparation of gamma globulin. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **103**, 250-252 (1960).
  27. Massover, W. H., Lacaze, J. C. and Durrieu, L.: The Ultrastructure of ferritin macromolecules. I. Ultrahigh voltage electron microscopy (1-3 MeV). *J. Ultrastruct. Res.* **43**, 460-475 (1973).
  28. Neremberg, S. T. and Pogojeff, G.: Preparative electrochromatography and electrophoresis using adapted sephadex and other columns. *Amer. J. Clin. Pathol.* **51**, 728-740 (1969).
  29. Fish, W. W., Mann, K. G. and Tanford, C.: The estimation of polypeptide chain molecular weight by gel filtration in 6 M guanidine hydrochloride. *J. Biol. Chem.* **244**, 4989 (1969).
  30. May, M. E. and Fish, W. W.: The isolation and properties of porcine ferritin and apoferritin. *Arch. Biochem. Biophys.* **182**, 396-403 (1977).
  31. Arosio, P., Adelman, T. G. Drysdale, J. W.: On ferritin heterogeneity. (further evidence for heteropolymers) *J. Biol. Chem.* **253**, 4451-4458 (1978).
  32. 高後 裕: Ferritin の生合成および代謝回転に関する研究. 第2報 Wheat germ lysate を用いた無細胞合成系によるラット肝 ferritin messenger RNA の翻訳. *札幌医誌* **48**, 553-563 (1979).
  33. Lavoie, D. J., Marcus, D. M., Otsuka, S. and Listowsky, I.: Characterization of ferritin from Human placenta: Implications for analysis of

- tissue specificity and microheterogeneity of ferritins. *Biochim. Biophys. Acta* **579**, 359-366 (1979).
34. Jones, B. M. and Worwood, M.: An immunoradiometric assay for the acidic ferritin of human heart: Application to human tissues, cells, and serum. *Clin. Chim. Acta* **85**, 81-88 (1978).
35. Watanabe, N., Niitsu, Y., Otsuka, S., Koseki, J., Kohgo, Y., Urushizaki, I., Kato, K., Ishikawa, E.: Enzyme immunoassay for human ferritin. *Clin. Chem.* **25**, 80-82 (1979).

---

別刷請求先: (〒060) 札幌市中央区南1条西16丁目  
札幌医科大学附属病院第4内科

大塚忍